

University of Groningen

Dynamics and flexibility of the SecYEG translocation channel

Bonardi, Francesco

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2011

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Bonardi, F. (2011). *Dynamics and flexibility of the SecYEG translocation channel*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse Samenvatting

Elke levensvorm heeft om naar behoren te kunnen functioneren een lipide membraan nodig die het interne waterachtige milieu van de cel scheidt van de externe omgeving. De lipide bilaag bestaat uit een hydrofobe matrix (phospholipiden) die membraaneiwwitten huisvest. Het vormt een actieve barrière die de import en export van grote en kleine moleculen controleert en die ondoorlaatbaar is voor kleine ionen zoals protonen waardoor de membraan in staat is een electrochemische protonen gradiënt in stand te houden waarmee allerlei energie vragende processen aan de membraan kunnen plaatsvinden.

Ongeveer 30% van de eiwwitten die worden geproduceerd in een *Escherichia coli* cel beoefent zijn functie buiten het cytoplasma. Om deze eiwwitten op de plek van bestemming te brengen bezit elke cel een of meerdere transportsystemen die verantwoordelijk zijn voor de translocatie of insertie van eiwwitten over of in het cytoplasmatisch membraan. Het Sec translocase is het belangrijkste eiwit transportsysteem in bacteriën. De centrale component van de translocase, het SecYEG complex (ook wel 'translocon' genoemd) bestaat uit drie integrale membraaneiwwitten die samen een eiwit doorlaatbaar kanaal vormen(1).

Eiwwitten, die ofwel een translocatie over of een insertie in de membraan moeten ondergaan, kunnen in het cytosol twee verschillende routes volgen om het translocon te bereiken (Figuur 1). In de co-translationele route - een route die voornamelijk wordt gevolgd door membraaneiwwitten - worden eiwwitten aan het translocon aangeboden als 'ribosoom gebonden nacent chains' (RNCs) via de activiteit van een 'signal recognition particle' (SRP) en de SRP receptor (FtsY). Nadat de RNCs zijn gebonden aan het SecYEG

complex en het SRP is vrijgekomen, vindt verlenging van de polypeptide keten plaats waarbij deze gelijktijdig via het translocon in het membraan wordt geïnserteerd. In de post-translationele route - een route die voornamelijk wordt gebruikt door eiwitten die worden uitgescheiden (pre-proteïnes) - houdt de moleculaire chaperone SecB de pre-proteïnes in een ontvouwen, translocatie competente toestand, en dirigeert hen naar het SecYEG-gebonden motoreiwit SecA. SecA gebruikt de energie die vrijkomt bij de binding en hydrolyse van ATP om het pre-proteïne stap voor stap over het membraan te transporteren (2, 3). Het SecYEG complex (4) bestaat uit SecY, het membraaneiwit dat fungeert als eiwit doorlaatbaar kanaal, en twee kleinere membraaneiwitten, SecE en SecG.

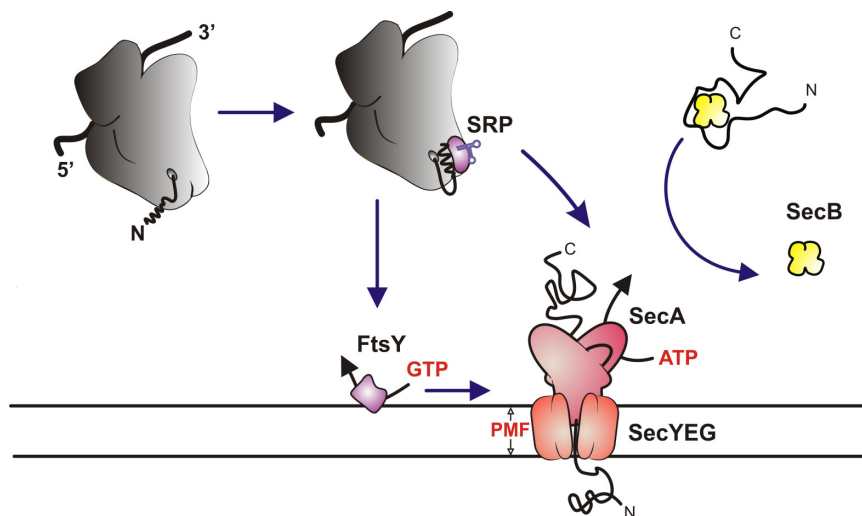


Fig. 1 Schematische voorstelling van de twee belangrijkste routes waarmee nieuw gesynthetiseerde eiwitten het translocon kunnen bereiken.

In de door middel van rontgendiffractie opgeloste drie-dimensionale structuur van het homologe SecY $\epsilon\beta$ complex van het archaeon *Methanocaldococcus jannaschii* (5), zijn de 10 transmembraan segmenten (TMSs) van SecY gegroepeerd in twee helften: de N-terminale TMSs 1-5 en 132

de C-terminale TMSs 6-10. De lus tussen TMS 5 en 6 functioneert als scharnier, waardoor de gehele structuur een 'venusschelp-achtige' conformatie krijgt (6). De venusschelp omvat een kanaal-achtige porie. Gezien vanaf de zijkant, lijkt de vorm van het kanaal op een zandloper, waarbij de centrale vernauwing bestaat uit hydrofobe aminozuur residuen. Aan de periplasmatische zijde van de membraan wordt het kanaal gevuld door een 're-entrance loop', ook wel bekend als de 'plug'. De 'plug', ook wel TMS2a genoemd, verbindt TMS1 en 2b en sluit het kanaal af in de rusttoestand (Figuur 2). Het SecYE β complex van *M. jannaschii* is gekristalliseerd in afwezigheid van het SecA motor eiwit en het ribosoom, en wordt in het algemeen beschouwd als de gesloten toestand van het translocon. In deze toestand wordt het kanaal goed afgedicht door de centrale constrictie die bestaat uit zes hydrofobe aminozuur residuen en het 'plug' domein (7). Er wordt verondersteld dat het signaal peptide van een pre-proteïne het kanaal opent doordat het inserteert in de lipide blootgestelde regio tussen TMS2 en 7 (lateral poort). Deze veronderstelde insertie van het signaal peptide zou moeten resulteren in het openen van de venusschelp, verwijding van de centrale constrictie en het verplaatsen van de 'plug'. De opgehelderde kristalstructuur van het SecA-SecYEG complex van *Thermotoga maritima* lijkt een pre-open conformationele toestand van het SecYEG complex te representeren. Ten opzichte van de "gesloten structuur" zoals gevonden in *Methanocaldococcus jannaschii* SecYE β een sterke verplaatsing van de laterale poort helixen TMS7, 8 en

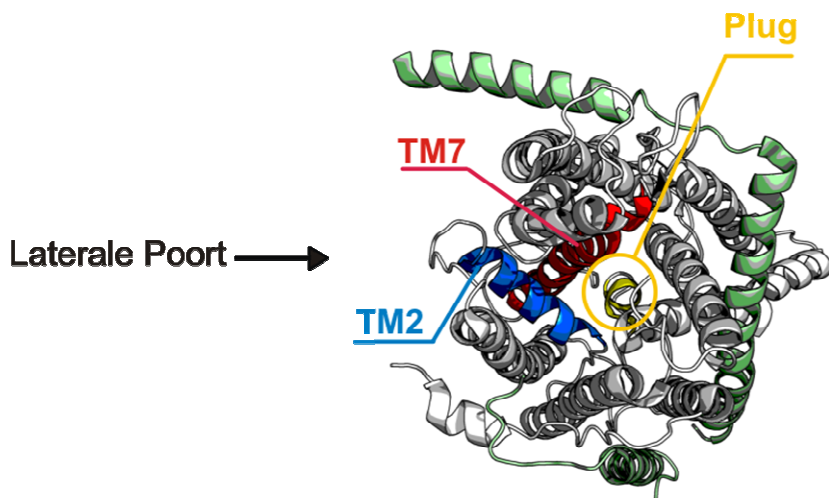


Fig. 2 Bovenaanzicht van de kristalstructuur van de gesloten toestand van SecYEG uit *Methanocaldococcus jannaschii*. De positie van de laterale poort is aangegeven en in het midden is het plug domein omcirkeld.

5, en een gedeeltelijke verplaatsing van de 'plug' is zichtbaar in de kristalstructuur van het *Thermotoga maritima* SecA-SecYEG complex. Dit resulteert in de vorming van een nauwe aan lipide blootgestelde opening van 5 Å tussen TMS2 and TMS7 (8). Een recente cross-linking analyse van de laterale poort regio suggereert dat de laterale poort zich moet openen tot minimaal 8 Å voor eiwittranslocatie (9). Dit resultaat bevestigt het belang van en de noodzaak tot opening van tenminste 5 Å zoals waargenomen in de kristalstructuur van *Thermotoga maritima* SecA-SecYEG. Het is aangetoond dat het SecYEG complex in de membraan hogere orde oligomeren kan vormen, voornamelijk dimeren (10, 11). Oligomerizatie wordt bevordert door de aanwezigheid van SecA of het ribosoom. Een cryo-electronmicroscopie structuur van het ribosoom-gebonden *E. coli* SecYEG complex met een inserterend membraaneiwit gaf

aanwijzingen dat SecYEG het ribosoom bindt als dimeer, waarbij de polypeptide keten die translocatie ondergaat gehuisvest is in één van de SecYEG kanalen (12). Echter, een andere studie liet zien dat een SecA geassocieerd pre-proteïne translocatie intermediair een associatie heeft met slechts één van de twee SecYEG monomeren binnen een covalent gestabiliseerde SecYEG dimeer (13). Tot op heden is het niet bekend of de dimeer van het SecYEG complex een functionele of een structurele eenheid representeert. In dit opzicht is het interessant te melden dat in een recente cryo-electron microscopische analyse van de homologe zoogdier en gist Sec61p complexen slechts één enkel translocon gebonden bleek te zijn aan het ribosoom (14).

Een centrale onbeantwoorde vraag betreft de functionele porie grootte van het translocatie kanaal. Om deze vraag te beantwoorden is de rekbaarheid van het kanaal gevormd door een SecYEG monomeer bestudeerd met behulp van moleculaire dynamica (15-17). Uit een studie waarbij virtuele zachte balletjes door een afzonderlijk SecY kanaal werden geduwd bleek dat zonder de laterale poort te openen, het kanaal een maximale functionele opening zou kunnen bereiken van 16 Å (17). In dit geval zou de dilatatie groot genoeg zijn om ontvouwen eiwitten, of zelfs α -helische polypeptide segmenten, te laten passeren. Aan de andere kant, wijzen experimentele studies met microsomen erop dat het eukaryote Sec61 complex in actieve toestand een zeer grote kanaal diameter van 40-60 Å kan aannemen (18). Een dergelijk grote porie kan niet gehuisvest worden door een enkel monomeer van Sec61p maar behoeft een oligomere structuur van het actieve translocatiekanaal. Daarnaast lijkt het bacteriële SecYEG complex weinig kieskeurig aangezien het de translocatie van pre-proteïnes met covalent gebonden niet polypeptide groepen of met

intramoleculaire disulfide bindingen toestaat (19, 20). Om de functionele porie grootte van het *Escherichia coli* SecYEG complex te bestuderen is in **Hoofdstuk 2**, de translocatie van pre-proteïnes bestudeerd die geconjugeerd zijn met grote rigide sferische moleculen (tetra-arylmethanen; TAMs). Aangezien de gebruikte TAMs strict gedefinieerde moleculaire dimensies hebben kunnen deze als een moleculaire liniaal gebruikt worden om de grootte van het translocatie kanaal in actieve toestand te bepalen. De TAMs werden covalent gebonden aan een unieke cysteine in de C-terminale regio van het proOmpA eiwit. In gevouwen OmpA neemt deze regio een α -helische structuur aan. De grootte van de gebruikte TAMs varieerden van ~ 8 to ~ 29 Å. Gebruikmakende van *E. coli* binnenmembraan vesikels bleek dat alle gesynthetiseerde TAMs geconjugeerd met proOmpA met uitzondering van het grootste molecuul, MeOTAM3 (~ 29 Å) onder normale condities (ATP and PMF) gemakkelijk translocatie ondergingen. De translocatie van de kleinere TAM conjugaties bleek echter wel sterk afhankelijk van de PMF. Als de grootte van een ontvouwen polypeptide in beschouwing wordt genomen, en aangenomen wordt dat een uitgerekte polypeptide keten conformatie 4 - 6 Å omvat, dan zou de maximale diameter van het translocatie kanaal ongeveer 22 - 24 Å zijn. Echter als het polypeptide segment een stabiele secundaire structuur heeft, dan zou de functionele kanaal opening groter moeten zijn. Alles bij elkaar genomen suggereren de resultaten dat het SecYEG complex zo flexibel is dat het kan uitdijen tot een opening die veel groter is dan noodzakelijk voor het herbergen van een ontvouwen polypeptide keten. Echter, in afwezigheid van een proton motive force ondergaan de grote TAM conjugaties geen translocatie meer, hetgeen suggereert dat de proton motive force de kanaal grootte moduleert. Opvallend is dat wanneer door

middel van een spacer de flexibiliteit van de laterale poort gelimiteerd wordt tot 8 Å, de organo-eiwit conjugaties nog steeds getransloceerd worden. Dit impliceert dat de translocatie en het passeren van het membraan door de conjugaten plaatsvindt binnen een afzonderlijk SecYEG kanaal. Het is mogelijk dat de regio rond de laterale poort een bijdrage levert aan het functionele openen van het kanaal. Het is niet duidelijk hoe lipide influx in het kanaal onder deze omstandigheden wordt voorkomen. Moleculaire dynamica studies geven echter aan dat een hoge thermodynamische barrière voorkomt dat de lipiden het waterachtige centrale kanaal binnendringen. Het is opmerkelijk dat de introductie van een grote 'bulky' organische verbinding in een pre-proteïne geen invloed heeft op de functionaliteit van het motoreiwit SecA of het SecYEG complex. Dit laat zien dat het systeem zich gemakkelijk aanpast aan grote niet-polypeptide groepen, mogelijk door 'piggy back' translocatie gedurende de interactie met de ongeconjugeerde hoofdketen. De onverwachte elasticiteit van het kanaal, samen met de recentelijke data die de fundamentele rol aantoont van de verplaatsing van de laterale poort tussen TMS2 en 7 tijdens een translocatie (9), heeft de weg geopend tot het ontwerpen van een SecYEG complex als nano-technologisch apparaat, waarin het openen van het kanaal extern kan worden gecontroleerd. In **Hoofdstuk 3**, hebben we een organische optische schakelaar geïntroduceerd in de laterale poort van het SecYEG translocatiekanaal, zodat translocatie met behulp van licht gecontroleerd kan worden. Als optische schakelaar werd het molecuul 4,4'-bis(bromomethyl)azobenzene (DBAB) gekozen. Het molecuul werd aan het eiwit gekoppeld middels twee specifieke cysteïnes in de laterale poort TM segmenten 2b en 7 van SecY. Met DBAB verschuift de afstand tussen de twee thiol groepen, gekoppeld met de para posities van de aryl groep van

DBAB, van $\sim 13\text{\AA}$ in de trans-isomer naar $\sim 5\text{\AA}$ in de cis-isomer wanneer het belicht wordt met zichtbaar en UV-licht, respectievelijk (Figuur 3). De incorporatie van de 'lichtschakelaar' in de laterale poort resulteert in een reversibele optische controle over het openen en sluiten van de poort waardoor een volledige controle over de translocatie kon worden gerealiseerd. Deze resultaten ondersteunen de noodzaak voor een dynamisch gedrag in de laterale poort regio gedurende een essentiële stap in eiwittranslocatie, en het is opmerkelijk dat de kracht uitgeoefend door het cis/trans isomerisatie proces van de azobenzene voldoende is om deze beweging tot stand te brengen. Bovendien is deze directe controle over de activiteit van een in de membraan ingebed eiwit translocatie kanaal nog niet eerder vertoond.

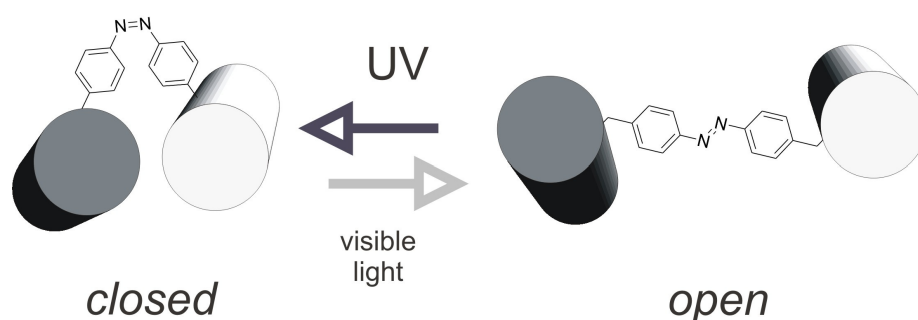


Fig 3. Schematische voorstelling van de moleculaire schakelaar gebruikt voor de controle van de opening and sluiting van de laterale poort en daarmee het translocatiekanaal. De twee α -helices die aangegeven staan komen overeen met TM7 en TM2. IN FIGURE: visible light: zichtbaar licht; closed: gesloten

De mogelijkheid een translocatie gebeurtenis te controleren via de laterale poort voorziet ons van een onderzoeksgereedschap waarmee de functionele oligomere toestand van SecYEG gedurende translocatie kan worden bestudeerd. Eerdere studies toonden aan dat SecYEG dimeren,

gecreëerd door een covalente verbinding (21) of door disulfide 'crosslinking' (22), actief zijn in post-translationele translocatie. In een andere studie werden individuele subeenheden in de covalente SecYEG dimeer geïnactiveerd door middel van een mutatie die een verstoring teweeg bracht in SecA afhankelijk eiwittransport. De mutatie resulteerde niet in een inactivatie van de covalent gebonden dimeer, wanneer aanwezig in slechts één van de protomeren. Dit resultaat gaf geen eenduidig antwoord op de vraag of een dimeer de functionele unit is, want dat vereist een demonstratie van een totale inactivatie door een dominante negatieve mutatie. We hebben geprobeerd deze vraag te beantwoorden door gebruik te maken van een meer ingrijpende methode. In **Hoofdstuk 4** hebben we een gefuseerde SecY dimeer gecreëerd met een dubbele cysteine mutatie in de laterale poort van één of beide SecY protomeren. Met een oxidatiemiddel hebben we een crosslink aangebracht in de laterale poort van de kanalen, om de translocatie te bestuderen, waarbij één of beide kanalen zich in een gesloten toestand bevond(en). Hoewel de gefuseerde dimeer normale translocatie activiteit vertoonde in de 'open' toestand, was de activiteit gereduceerd wanneer één van beide laterale kanalen van de protomeren zich in 'gesloten' toestand bevond. Echter, de door oxidatie geïnduceerde sluiting van beide laterale poorten in de gefuseerde dimeer resulteerde niet in een totale remming van translocatie. Verder bleek in de gebruikte experimentele opzet geen kwantitatieve bepaling van de mate van 'crosslinking' mogelijk, hetgeen de interpretatie van de resultaten in de studie naar de functionele oligomere toestand van het kanaal bemoeilijkte. Om aan te tonen dat een gefuseerde dimeer inderdaad een functionele eenheid vormt, is het van belang om naar alternatieve benaderingen te zoeken om de individuele kanalen te blokkeren. Het kanaal zou

geblokkeerd kunnen worden door een groot molecuul (bijvoorbeeld één van de moleculen die werden besproken in Hoofdstuk 2 van dit proefschrift) te introduceren bij de in- of uitgang van het translocatiekanaal. Deze moleculen zouden bevestigd kunnen worden aan een enkel cysteine residu, of mogelijk aan een moleculaire schakel, zodat het kanaal reversibel geopend en gesloten kan worden. Aan de andere kant, om een antwoord te krijgen op de vraag of SecYEG functioneert als oligomeer, zou een genetische methode mogelijk het meest effectief kunnen zijn. Er zou bijvoorbeeld een strategie ontwikkeld kunnen worden voor de selectie van conditioneel lethale mutaties die translocatie beletten in de aanwezigheid van het wild-type SecYEG. Een andere methode zou kunnen zijn inactieve varianten van SecY te combineren met mutaties in verschillende allelen, om vervolgens een genetische screening uit te voeren, waarbij gezocht wordt naar 'gain of function' mutaties. Eveneens zou gebruik gemaakt kunnen worden van een technisch uitdagendere benadering, zoals kwantitatieve 'single molecule studies', waarbij gekeken wordt naar het aantal SecYEG kanalen die betrokken zijn bij afzonderlijke translocatie gebeurtenissen.

De mogelijkheid om translocatie van grote niet natuurlijke substraten door het SecYEG kanaal tot stand te brengen en het feit dat de introductie van een organische moleculaire schakelaar in een kritiek gedeelte van het kanaal, zoals de laterale poort, de functionaliteit van het translocatieproces niet beïnvloed, zijn belangrijke voorbeelden van hoe biologische systemen kunnen worden gemanipuleerd tot nanotechnologische gereedschappen die inzicht verschaffen in hoeveel een natuurlijk systeem kan worden veranderd zonder verlies van functie. Dit onderzoek betreft een belangrijke stap in de richting van het creëren van biologische systemen met

toegevoegde functionaliteit, en schept nieuwe mogelijkheden voor potentiële toepassingen in structureel biologisch onderzoek. Bijvoorbeeld in 'fast fourier', infrarood, en hoge resolutie electronmicroscopie studies zouden kritieke conformationele veranderingen kunnen worden geïnduceerd door middel van een licht-geïnduceerde schakelaar zonder dat het systeem hoeft te worden geperturbeert. Tenslotte, zou het interessant zijn om het SecYEG kanaal te koppelen aan een alternatieve motor, mogelijk zelfs een organisch synthetische machine, om een hybride te creëren met grotere robuustheid en eventueel gewijzigde specificiteit. De hoge rekbaarheid van het SecYEG kanaal levert unieke kansen bij het ontwerpen van zo'n hybride systeem, maar vooruitgang in deze richting vormt een grote uitdaging door ons beperkte inzicht in het mechanisme van het openen van het kanaal en de rol van het SecA motor eiwit in dit proces.